

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-281871

⑤ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和62年(1987)12月7日

C 07 D 265/26
C 12 P 17/14
// A 61 K 31/535

ABD
ADU
AED

7624-4C
2104-4B

(C 12 P 17/14
C 12 R 1:465)

6760-4B 審査請求 未請求 発明の数 2 (全11頁)

⑬ 発明の名称 新規生理活性物質ベナドロステン及びその製造法

⑰ 特 願 昭61-121301

⑱ 出 願 昭61(1986)5月28日

⑫ 発 明 者 梅 沢 浜 夫 東京都練馬区豊玉北4丁目23番地
⑫ 発 明 者 青 柳 高 明 藤沢市本鰐沼3丁目3番6号
⑫ 発 明 者 浜 田 雅 東京都新宿区内藤町1丁目26番地
⑫ 発 明 者 岡 見 吉 郎 東京都大田区田園調布4丁目18番14号
⑫ 発 明 者 竹 内 富 雄 東京都品川区東五反田5丁目1番11号
⑰ 出 願 人 財団法人 微生物化学 東京都品川区上大崎3丁目14番23号
研究会
⑭ 代 理 人 弁理士 八木田 茂 外2名

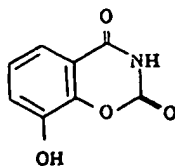
明 細 書

1. 発明の名称

新規生理活性物質ベナドロステン及びその
製造法

2. 特許請求の範囲

1. 式



を有する生理活性物質ベナドロステン。

2. ストレプトミセス属に属するベナドロステン生産菌を培養し、その培養物からベナドロステンを採取することを特徴とする、生理活性物質ベナドロステンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は抗ポリ(A D P-リボース)シンターゼ作用とマクロファージ活性化作用を有する新規な生理活性物質ベナドロステン(Benadrostin)

及びその製造法に関するものである。

(従来の技術及び発明が解決しようとする問題点)

従来、数多くの生理活性物質が発明されて医薬品、農薬等の分野で実用化されている。しかしながら、まだ有効な物質が見出されないため解決されていない医療あるいは産業分野が多く残されている。例えばガン治療のための化学療法剤、免疫増強剤は近年長足の進歩をとげ、外科療法、放射線療法と相まっていくつかのガンについての治療が可能になつてきているが、まだ未解決な部分が多く、新しい作用をもつ新規の制ガン剤、免疫増強剤は常に要望されている。

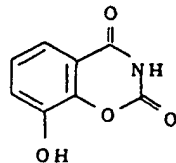
本発明者らは、以上のような点に着目し、新規な生理活性物質を提供するとともに、その製造法を確立することによつてこれを解決しようとするものである。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、上述の期待に答えるべく、ガンその他多くの疾病に関与すると考えられているポリ(A D P-リボース)シンターゼに対し阻害

作用を有する物質がこれら疾病の治療につながる
と考え、探索を続けていたところ、ストレプトミ
セス(Streptomyces) 属に属するある菌株の培
養物中にポリ(ADP-リボース)シンターゼ
を強く阻害する物質が生産されていることを見出
した。その有効物質を単離することに成功しベナ
ドロステン(Benadrostin)と命名してその生物
学的特性を調べていたところ、ベナドロステンが
さまざまな生体防御のシステムに深く関与するマ
クロファージを強く活性化することが見出された。
さらにベナドロステンの理化学的性状及び生物学
的性状を確定することにより本発明を完成した。

したがって第一の本発明は次式



試薬、ギッブス試験に陽性であり、ニンヒド
リン試薬、ライドンスミス試験に陰性である。

02 溶解性：酢酸エチル、アセトン、メタノー
ル、ジメチルスルホキシドに易溶であり、
ベンゼン、クロロホルム、水に不溶である。

03 シリカゲル薄層クロマトグラフィーのRf値
展開溶媒ベンゼン-酢酸エチル(1/1) :

0.48

展開溶媒クロロホルム-メタノール(10:1) :

0.30

04 塩基性、酸性、中性の区分：酸性
(発明の作用)

本発明のベナドロステンはガン細胞その他対
する生体防御に深く関与するマクロファージを活
性化することが見出された。

ガン細胞に対するマクロファージの細胞障害性
のベナドロステンの増強作用についてはLUIO P.
RUO ち：「The J. of Immunology」120巻、
3号、(1978 3月)の方法に従い測定した。
すなわち、メチルコランズレンで化学発癌させた

を有する新規生理活性物質ベナドロステンを提供
するものである。

ベナドロステンの理化学的性質は下記の通りで
ある。

(1) 色および形状：無色プリズム状結晶

(2) 元素分析値 :

C 53.42% , H 2.73% , N 7.59%

(3) 分子式 : $C_8H_5NO_4$

(4) 分子量 : 179 EI-MS m/z

(5) 融点 : 190-192℃

(6) 比旋光度 : $[\alpha]_D^{20} 0^\circ$ (c1, メタノール)

(7) 紫外線吸収スペクトル：添付図面の第1図
に示す。

(8) 赤外線吸収スペクトル：添付図面の第2図
に示す。

(9) 水素核磁気共鳴スペクトル：添付図面の
第3図に示す。

00 炭素核磁気共鳴スペクトル：添付図面の
第4図に示す。

00 呈色反応：シリカゲル薄層上でカメレオン

顕性肉腫L-1023にトリチウムラベルしたチ
ミジンを取り込ませた。このガン細胞に対しマウ
ス由来のマクロファージが細胞障害性を示し、ガ
ン細胞を破壊して溶解したチミジンが反応液中に
出てくることを指標として本物質の効果を検討し
た。

この方法では、マウスから調製したマクロファ
ージ0.1mlをタイタープレートに吸着させ単層化
し、10%の牛の胎児の血清を含むRPMI-
1640培地(GIBCO LABORATORIES 製)
の50μlと、同様の培地中にガン細胞を含む溶
液の50μlと、ベナドロステン試料10μlと
を加え45時間37℃で5%二酸化炭素の存在下
で培養した。この反応液上清を採取して液体シン
チレーションカウンターで溶解化合物を測定する
ことにより判定してガン細胞障害性を測定した。
結果は次の表1表に示す通りである。

第 1 表

試料化合物と供試量	細胞障害率(%)	
	マクロファージの存在下	マクロファージの非存在下
ベナドロステン 100μg	62.6%	15.3
" 33 "	58.3	11.7
" 11 "	0.0	-
" 3.7 "	0.0	-

但し細胞障害率(%)は次式で計算した。

$$\text{細胞障害率} = \frac{\begin{aligned} & \left[\begin{aligned} & \text{試料を入れた時に観測されたカウント (dpm)} \\ & - \left[\begin{aligned} & \text{試料を入れない時のカウント (dpm)} \\ & \times 100 \end{aligned} \right] \end{aligned} \right]}{\begin{aligned} & \left[\begin{aligned} & 0.5\% \text{ SDS でガン細胞を処理した時} \\ & \text{に観測されたカウント (dpm)} \\ & - \left[\begin{aligned} & \text{試料を入れない時のカウント (dpm)} \end{aligned} \right] \end{aligned} \right]} \end{aligned} \times 100$$

放線菌で、MH499-O'F/の菌株番号が付された。

MH499-O'F/株の菌学的性状は次の通りである。

1. 形態

MH499-O'F/株は、顕微鏡下で分枝した莖中菌糸より、真つすぐな気菌糸を伸長するが、時にはその先端はかぎ状を呈する。輪生枝は形成しない。気菌糸の先端には、30個以上の胞子の連鎖をみとめ、胞子の大きさは、0.4~0.6×0.6~0.8ミクロン位である。なお、胞子の表面は、平滑である。

2. 各種培地における生育状態

色の記載について〔〕内に示す標準は、コンテナ・コーポレーション・オブ・アメリカのカラ・ハーモニー・マニュアル(Container Corporation of AmericaのColor Harmony Manual)を用いた。

- (1) シュクロース・硝酸塩寒天培地(27℃培養)：

本発明物質ベナドロステンの30μgの添加はガン細胞に対するマクロファージの細胞障害性に顕著な増強作用をもたらすことが認められた。

本物質のマウスに対する急性毒性は250mg/kg(腹腔内投与)で全く毒性が認められない。

従つて、本発明のベナドロステンはこれで活性化されたマクロファージの働きを介して抗腫瘍剤としての用途が期待される。

更に、第二の本発明は、ストレプトミセス属に属するベナドロステン生産菌を培養し、その培養物からベナドロステンを採取することを特徴とする生理活性物質ベナドロステンの製造法を提供するものである。

本発明に使用させるベナドロステン生産菌の一例としては、本発明者らにより東京都品川区の土壌より新たに分離されたMH499-O'F/株がある。MH499-O'F/株の菌学的性状は次の通りである。

この生産菌は昭和60年2月、微生物化学研究所において、当研究所構内の土壌より分離された

無色の発育上に、うつすらと明るい灰色の気菌糸を着生し、溶解性色素はみとめられない。

- (2) グルコース・アスパラギン寒天培地(27℃培養)：

無色～うす黄色の発育上に、灰白～明るい灰色(2fe, Covert Gray)の気菌糸を着生し、溶解性色素はみとめられない。

- (3) グリセリン・アスパラギン寒天培地(ISP-培地5, 27℃培養)：

うす茶～黄茶色(4Bg, Lt Spice Brown)の発育上に、灰白～明るい灰色(2fe, Covert Gray)の気菌糸を着生する。溶解性色素はわずかに茶色味をおびる。

- (4) スターチ・無機塩寒天培地(ISP-培地4, 27℃培養)：

うす黄色の発育上に、明るい灰色(2fe, Covert Gray)の気菌糸を着生する。溶解性色素はわずかに黄色味をおびる程度である。

- (5) テロシン寒天培地(ISP-培地7, 27℃培養)：

うす黄色の発育上に、灰白～明るい灰色〔2fe, Covert Gray～2ih, Dk Covert Gray〕の気菌糸を寄生する。溶解性色素は、わずかに黄色味をおびる。

(6) 栄養寒天培地(27℃培養)：

黄茶～うす茶色の発育上に、明るい灰色の気菌糸を寄生し、溶解性色素はうす黄茶をおびる。

(7) イースト・麦芽寒天培地(ISP-培地2, 27℃培養)：

うす黄～うす茶色の発育上に、灰白～明るい灰色〔2fe, Covert Gray～3fe, Silver Gray〕の気菌糸を寄生し、溶解性色素はわずかに黄色味をおびる。

(8) オートミール寒天培地(ISP-培地3, 27℃培養)：

無色～うす黄色の発育上に灰白～明るい灰色の気菌糸を寄生し、溶解性色素はわずかに黄色味をおびる。

(9) グリセリン・硝酸塩寒天培地(27℃培養)：

無色の発育上に明るい灰色〔2fe, Covert Gray

～3fe, Silver Gray〕の気菌糸を寄生し、溶解性色素はみとめられない。

00 スターチ寒天培地(27℃培養)：

無色～うす黄茶色の発育上に、明るい灰色の気菌糸を寄生し、溶解性色素はわずかに黄色味をおびる。

01 リンゴ酸石灰寒天培地(27℃培養)：

発育はうす黄色、気菌糸は寄生しないか、あるいはうつつすらと明るい灰色の気菌糸を寄生する。溶解性色素はわずかに黄色味をおびる程度である。

02 セルロース(伊紙片添加合成液、27℃培養)：

発育は無色、培養後14日目に明るい灰色の気菌糸を寄生し溶解性色素はみとめられない。

03 ゼラチンの穿刺培養：

単純ゼラチン培地(20℃培養)では、発育は無色～うす黄色、気菌糸は培養後7日目頃から寄生し、灰白～明るい灰色である。溶解性色素は黄色味をおびる。

グルコース・ペプトン・ゼラチン培地(27℃

培養)では発育は無色～うす茶色、気菌糸は灰白～明るい灰色を呈する。溶解性色素はみとめられないか、わずかに黄色味をおびる程度である。

04 脱脂牛乳(37℃培養)：

発育は無色～うす黄色、気菌糸は寄生せず、溶解性色素はみとめられない。

3. 生理的性質

(1) 生育温度範囲：

グルコース・アスパラギン寒天(グルコース1.0%、L-アスパラギン0.05%、リン酸ニカリウム0.05%、組寒天3.0%、pH 7.0)を用い、20℃、24℃、27℃、30℃、37℃、50℃の各温度で試験した結果、50℃を除いて、そのいずれの温度でも発育したが、37℃での生育は不良である。最適生育温度は、27℃～30℃付近と思われる。

(2) ゼラチンの液化(20%単純ゼラチン、

20℃培養およびグルコース・ペプトン・ゼラチン、27℃培養)：

単純ゼラチン培地においては、培養後11日目

頃に、また、グルコース・ペプトン・ゼラチン培地においては、培養後8日目頃から液化がはじまる。その液化作用は、中等度～弱い方である。

(3) スターチの加水分解(スターチ・無機塩寒天培地およびスターチ寒天培地、いずれも27℃培養)：

培養後3日目頃より水解性がみとめられ、その作用は中等度～強い方である。

(4) 脱脂牛乳の凝固・ペプトン化(脱脂牛乳、37℃培養)：

培養後5日目頃より凝固がはじまり、8日目には凝固完了、直ちにペプトン化がはじまる。ペプトン化は、培養後3週間を経過しても完了せず、その作用は中等度である。

(5) メラニン様色素の生成(トリプトン・イースト・プロス、ISP-培地1；ペプトン・イースト・鉄寒天、ISP-培地6；チロシン寒天、ISP-培地7、いずれも27℃培養)：

いずれの培地においても、みとめられない。

(6) 炭素源の利用性(プリドヘム・ゴトリーブ寒天培地、ISP-培地9、27℃培養):

D-キシロース、D-グルコース、D-フラクトース、D-マンニトールを利用して発育し、L-アラビノースはおそらく利用すると判定され、シュクロース、イノシトール、L-ラムノース、ラフィノースは利用しない。

(7) リンゴ酸石灰の溶解(リンゴ酸石灰寒天、27℃培養):

培養後10日目ごろから発育周辺のリンゴ酸石灰を溶解する。その作用は、中等度である。

(8) 硝酸塩の還元反応(0.1%硝酸カリ含有ペプトン水、ISP-培地8、27℃培養):

くり返しの試験で、陰性の場合と陽性の場合がある。

以上の性状を要約すると、MH499-O'F/株は、その形態上基中菌糸から真つすぐな気菌糸を伸長し、30個以上の孢子連鎖を形成する。孢子の表面は平滑であり、又、孢子のうをみとめず、嚢生枝も形成しない。

-0230(ISP5062)とMH499-O'F/株とを寒地に比較検討し、それらの菌学的性質を次の第2表に示した。

種々の培地で、発育は無色〜うす黄あるいはうす黄茶色であり、気菌糸は、白〜明るい灰色を呈する。溶解性色素はみとめられないか、わずかに黄〜黄茶色をおびる。メラニン様色素の生成は陰性であり、また澱粉水解性がみとめられる。蛋白分解力は中等度〜弱い方である。

なお、この菌株の全菌体中に含まれる2,6-ジアミノピメリン酸はL型であり、上記の性状と考えあわせると、MH499-O'F/株がストレプトミセス(*Streptomyces*)属に属することは明らかである。

これらの性状よりMH499-O'F/株に類似の既知菌種を検索すると、ストレプトミセス・フラボグイレンス(*Streptomyces flavovirens*): 文献「International Journal of Systematic Bacteriology」18巻、114頁(1968); 「Bergey's Manual」6版、940頁、(1948) Waksmanの「The Actinomycetes」2巻、210頁、(1961)、があげられる。そこで、ストレプトミセス・フラボグイレンス IMC 9

第 2 表

菌 学 的 性 質	MH499-0'F /	ストレプトミセス・フラボグイレンス IMO 9-0230 (ISP5062)
菌 体 の 形 態	まつすぐ(RP)	まつすぐ(RP)
らせん形成	—	—
輪生枝の形成	—	—
胞子の表面	平 滑	平 滑
菌 体 の 色	白〜明るい灰	白〜明るい灰
発 育 の 色	無色〜うす黄、うす黄茶	うす黄〜うす黄茶
溶 解 性 色 素	—黄、黄茶	黄
メラニン色素の形成		
ISP-増地 /	—	—
1	—	—
6	—	—
7	—	—
スターチの加水分解	+	+
牛 乳 の 凝 固	+	+
牛 乳 の ペ プ ト ン 化	+	+
ゼラチンの液化		
単純ゼラチン	+	+
グルコース・ペプトン・ゼラチン	+	+
結晶塩の還元反応	—又は+	—
炭素源の利用性		
D-グルコース	+	+
L-アラビノース	+	+
D-キシロース	+	+
D-フラークトース	+	+
シクロロース	—	—
イノシトール	—	—
L-ラムノース	—	+
ラフィノース	—	—
D-マンニトール	+	+

注：—付：おそらく利用している。

*：文献 Waksman の「The Actinomycetes」2巻、210頁(1961)

第2表から明らかなように、MH499-0'F/株とストレプトミセス・フラボグイレンスは非常に良く似た性質を示している。両者の相異点は、L-ラムノースの利用と単純ゼラチンの液化性である。ストレプトミセス・フラボグイレンスは、単純ゼラチンの場合、液化を示さなかつたが、文献上では液化をみとめており、又、グルコース・ペプトン・ゼラチンの液化性は両者が合致しているので、大きな差異とは考えられない。L-ラムノースの利用については、相異がみとめられるが、他の種への移行は考えにくい。

MH499-0'F/株は、ストレプトミセス・フラボグイレンスに極めて近縁な種と思われる。従つて、MH499-0'F/株をストレプトミセス・フラボグイレンス (*Streptomyces flavovirens*) MH499-0'F/と同定した。なお、MH499-0'F/株を工業技術院微生物工業技術研究所に寄託申請し、昭和61年2月20日、微工研菌寄第8658号として受託された。

MH499-0'F/株は他の放線菌の場合に見

られるように、その性状が変化しやすい。たとえば、MH499-0'F/株の、またはこの株の由来する突然変異株(自然発生または誘発性)、形質接合体または遺伝子組換え体であつても、生理活性物質ベナドロステンを生産するものは全て本発明に使用できる。

本発明の方法では、前記の菌を通常の微生物が利用しうる栄養物を含む培地で培養する。栄養源としては、グルコース、水あめ、デキストリン、シュクロース、澱粉、糖みつ、動・植物油等を使用できる。また窒素源として、大豆粉、小麦はい芽、コーンステイプリカー、綿実がす、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、硫酸アンモニウム、硝酸ソーダ、尿素等を使用できる。その他、必要に応じてナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、燐酸、硫酸、及びその他のイオンを生成することができる無機塩類を添加することは有効である。また菌の発育を助け、生理活性物質ベナドロステンの生産を促進するよう有機および無機物を適当に添加するこ

とができる。

培養法としては、好氣的条件での培養法、特に深部培養法が最も適している。培養に適當な温度は15~40℃であるが、多くの場合、26~30℃付近で培養する。生理活性物質ベナドロステンの生産は培地や培養条件により異なるが、振とう培養、タンク培養とも通常2~10日の間でその蓄積が最高に達する。培養液中の生理活性物質ベナドロステンの蓄積量が最高になつた時に培養を停止し、培養液から目的物質を単離精製する。

かく生産されるベナドロステンは前記の理化学的性状を有するので、その性状に従つて培養物から抽出、精製することが可能であるが特に以下の方法により効率的に抽出、精製することができる。

ベナドロステンはベナドロステン生産菌の培養液中および菌体中に存在する。ベナドロステンを培養物から採取するに当つては、培養液から吸着剤に吸着および脱離させる方法で高収率に採取できる。即ち培養液を吸着剤樹脂XAD-4(オルガノ社製)のカラムに通し、水で洗浄し、

腺からのヒストン、0.26 mM のニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド、1.3 ピコキュエリーの¹⁴Cの同位体で標識したニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチドを含む反応液に、SHIZUTAらの方法の改良法による酵素の精製法で、プロタミンによる沈殿、硫酸アンモニウムによる分画により精製したポリ(ADP-リボース)シンテターゼ溶液の5 μlを加えて25℃で10分間反応した。その後10 μl中に10 μgの仔牛の胸腺からのデオキシリボ核酸、50 mMのエチレンジアミン四酢酸10 mMのトリス-塩酸緩衝液(pH 5.6)を含む反応停止液を加えよく振とうした。反応液のうちの50 μlをとり0.1 Mピロリン酸ナトリウム液に浸した後乾燥させた直径24 mmの伊紙にしみ込ませた後伊紙の枚数の10倍量の0℃の10%トリクロ酢酸を加えよく振り、10分間放置した後これを捨てた。この操作を3回繰り返した後最後にエタノールを加え軽くゆすいで捨て、赤外線ランプの下で伊紙を乾燥させバイアルに入れそれにアクアゾールII(NENリサーチ・プロ

アセトン等の有機溶媒で溶離する。溶離液から有機溶媒を留去した後、酢酸エチル等の水と自由に混和しない有機溶媒で有効成分を抽出する。抽出液の溶媒を留去して得たベナドロステン粗物質を少量の溶媒に溶解しシリカゲル等の担体を使用したクロマトグラフィーを適宜組み合わせでベナドロステンを単離する。

ベナドロステンの培養工程ならびに精製工程中での追跡は次の方法による抗ポリ(ADP-リボース)シンテターゼ活性の測定に基づいて行つた。

抗ポリ(ADP-リボース)シンテターゼ活性の測定は、SHIZUTA(YUTAKA SHIZUTA, SEUI ITO, KOH NAKATA, OSAMU HAYAISHI「Methods in Enzymology」66巻、159-165頁(1980))に記載の方法の改良法で行つた。即ち、小試験管に検体を入れ乾燥させ、それに45 μl中に100 mMのトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)、10 mMの塩化マグネシウム、1 mMのジチオスレイトール、100 μgの子牛の胸腺からのデオキシリボ核酸、100 μgの仔牛の胸

腺(ダクン社製)を加え1分後の標識体のカウント(a)を測定した。同時にベナドロステンを含まない盲検のカウント(b)を測定し、ポリ(ADP-リボース)シンテターゼ阻害率を式 $((b-a)/b) \times 100$ により計算した。この定量方法で0.8 μg/mlのベナドロステンはポリ(ADP-リボース)シンテターゼ活性を50%阻害した。

(実施例)

次に実施例によつて本発明のベナドロステンの製造例を示す。

実施例1

種培地および生産培地として、グリセリン1.5%、ファーマゲディア1.5%、塩化ナトリウム0.3%、L-アスパラギン0.2%を含む培地を用いた。なお殺菌前pHは全てpH 7.4に調整して使用した。

前記種培地110 mlを分注した500 ml容三角フラスコを120℃で20分間殺菌し、これにストレプトミセス・エスピー・MH499-0'F(FERM P-8658)の斜面培養の1~2白金

耳を接種し、28℃で2日間振とう培養し第1種培養とした。ついで、種培地110mlずつを分注した500ml容三角フラスコ10本を120℃で20分間殺菌し前記第1種培養3mlずつを接種し、28℃で2日間振とう培養し、これを第2種培養とした。予め120℃で20分間殺菌した15ℓの生産培地を含む30ℓ容ジャーファーマンター2基に前記の第2種培養500mlずつを接種し、28℃で3日間通気(15ℓ/分)攪はん(100rpm)培養した。培養終了後伊過助剤として珪素土を加え伊過し、菌体を含む固形物及び培養伊液を得た。

得られた伊液30ℓを吸着樹脂XAD-4(オルガノ社製)3ℓのカラムにかけ水で洗浄し、50%アセトンで溶離した。この溶離液を濃縮して、アセトンを留去して得られた2ℓの濃縮液を塩酸を用いてpHを2.0に調節した。この濃縮液に酢酸エチル2ℓを加えよく攪はんして有効成分を抽出した。これを1ℓに濃縮し、水酸化ナトリウム溶液を用いてそのpHを9.0に

調節した。これに水1ℓを加えよく攪はんして今度は水層にある有効成分を集めた。これを塩酸を用いてpHを2.0に調節し、酢酸エチル1ℓを加え、よく攪はんして有効成分を抽出し、これを濃縮して褐色の粗物質1.2gを得た。

この粗物質をクロロホルムに懸濁し、あらかじめクロロホルムで充てんしたシリカゲルC-200(和光純薬工業社製)800mlのカラムにかけ、クロロホルムで洗浄した。続いて酢酸エチルで溶離した。この溶離液を濃縮してうすい褐色の粉末4.2gを得た。さらにこの粉末を500mlの酢酸エチルに溶解し、pHを水酸化ナトリウム溶液で9.0に調節した。これに500mlの酢酸エチルを加えよく攪はんし、有効成分の少ない酢酸エチル層を除いた。次に水層のpHを塩酸を用いて7.0に調節し、500mlの酢酸エチルを加え、よく攪はんし、有効成分を抽出した。抽出液を濃縮して黄色の粉末0.9gを得た。

次いでこの粉末をクロロホルムに懸濁し、あらかじめクロロホルムで充てんしたシリカゲルC-

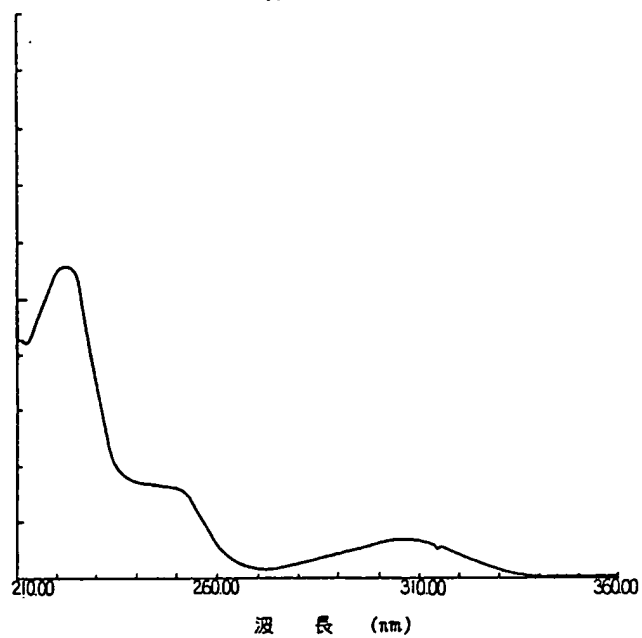
核磁気共鳴スペクトルを示す。

300(和光純薬工業社製)50gのカラムにかけ、クロロホルムで洗浄し、クロロホルム-酢酸エチル(1:1)の混液で溶出した。溶出面分はシリカゲル薄層クロマトグラフィー(メルク社、ヤーゼルゲル60F254、展開溶媒:クロロホルム-メタノール(10:1))を行い、Rf値0.27にUV吸収をもつスポットを示す面分を集めて減圧下濃縮して白色粉末450mgを得た。この白色粉末をメタノールより結晶化してベナドロステンの無色プリズム状結晶320mgを得た。融点190~192℃、 $[\alpha]_D^{20} 0^\circ$ (c1,メタノール)。

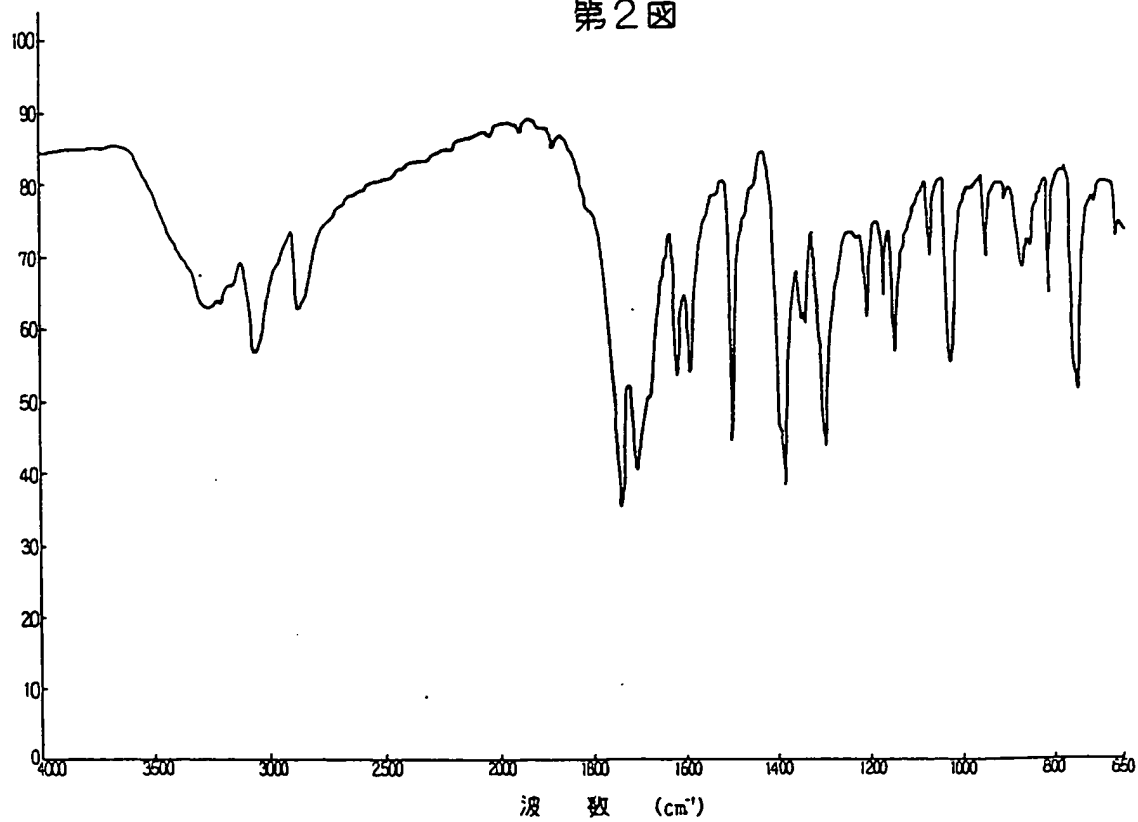
4 図面の簡単な説明

第1図はベナドロステンの10μg/mlメタノール溶液の紫外線吸収スペクトルを示し、第2図はベナドロステンの臭化カリウム錠内での赤外線吸収スペクトルを示し、第3図はベナドロステンの重アセトン中で測定した400MHz水素核磁気共鳴スペクトルを示し、第4図はベナドロステンの重アセトン中で測定した400MHz炭素核

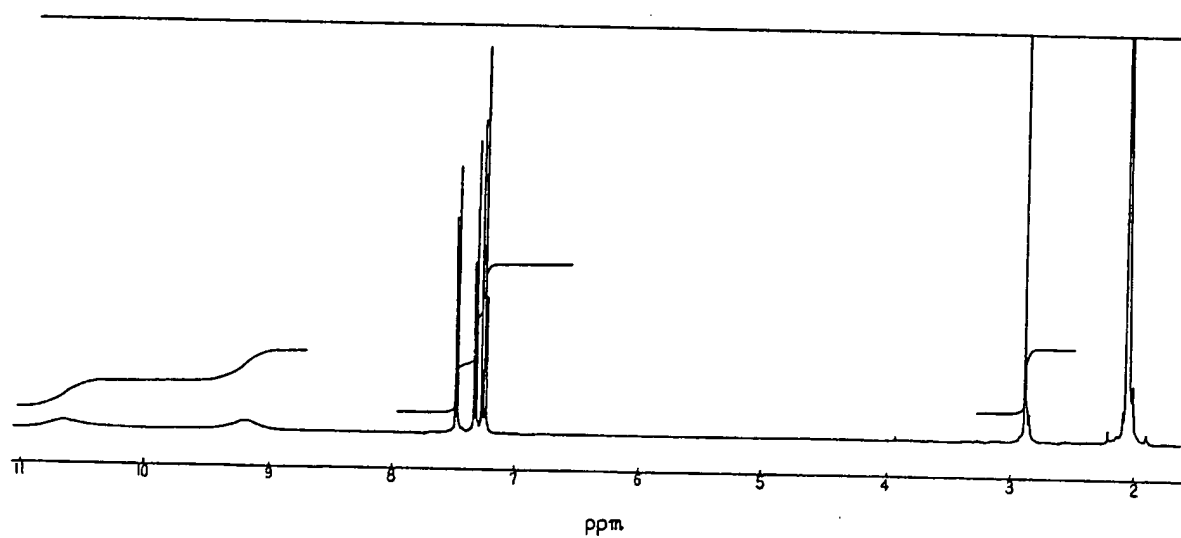
第1図



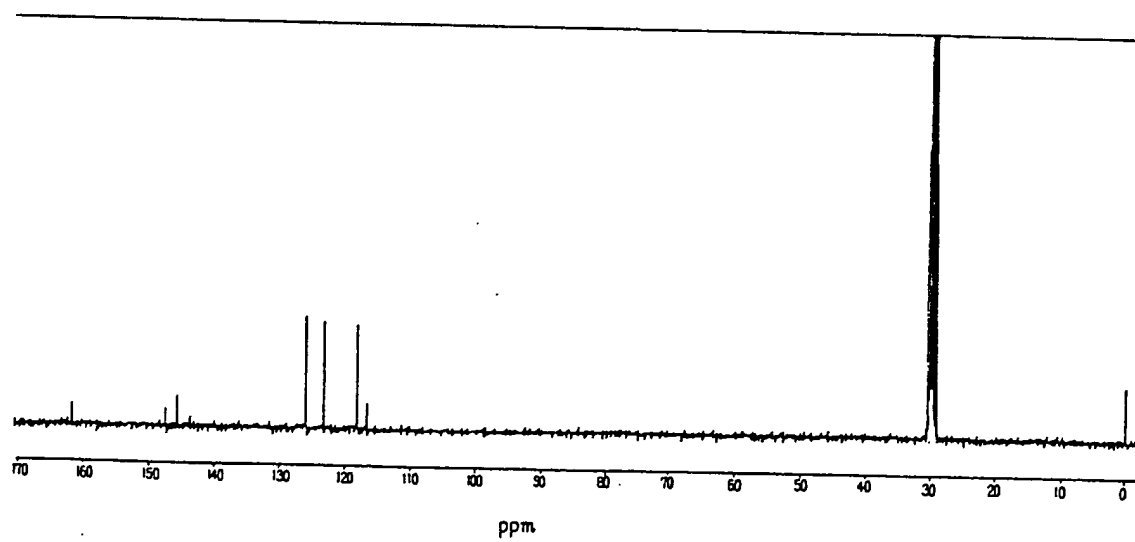
第2図



第3図



第4図



手続補正書(自発)

昭和61年10月24日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和61年特許願第121301号

2. 発明の名称

新規生理活性物質ペナドロステン及びその製造法

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

住 所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号

名 称 財団法人 微生物化学研究会

4. 代 理 人

〒105 住 所 東京都港区西新橋1丁目1番15号
物産ビル別館 電話(591)0261

(6645)



八 木 田 茂



5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

(1) 明細書第3頁4行の「物」を削除して「液」を挿入する。

(2) 同第3頁10行の「が見出され」を「を見出し」と補正する。

(3) 同第5頁下から4行の「のべ」を「におけるべ」と補正する。

(4) 同第9頁12行の「は」の次の句読点を削除する。

(5) 同第23頁5行の「後、伊紙・・・/0倍量の」を削除して「後、伊紙1枚当り10ccの」を挿入する。

THIS PAGE BLANK (USPTO)